免疫機能分析マニュアル

肉用鶏特別飼育分科会

目　　次

＊(　　)内は担当道府県

はじめに(免疫関連指標の無または低抗菌剤飼育への応用)

米沢女子短期大学・高橋和昭

抗生物質使用とブロイラー生産

家畜への抗生物質および合成抗菌剤の使用は、腸の健康維持による抗病性の付加と、それに伴う生産性の向上をもたらしてきた。しかし、薬剤耐性菌の出現や抗生物質の生産物への残留の懸念などから、成長促進を目的とした抗生物質（抗生成長促進物質：Anti microbial growth promoter）の使用は制限されつつある。このような情勢から、抗生物質の使用以外の方法で動物生産を維持する方法を確立することが求められている。その方法として、衛生管理の改善、抗病性獲得に主眼をおいた育種改良、そして動物自体が保有する生体防御に重要な役割を果たす免疫機能の適正な保持・活性化が考えられている。

家畜生産において、生体防御の第一線を担う免役機能の適正な保持または活性化は健全かつ安定的な生産向上重要であると思われる。動物生産に影響を及ぼす要因としては、病原微生物感染ばかりでなく、飼料・栄養に由来するもの、薬剤、温度など環境条件に由来するもの、不適正な動物の取り扱いなど種々考えられる（表 1）。非病原菌との接触、アンモニア、埃の発生などは通常の飼育条件では避け難いがたい。このような環境で飼育された動物は、特別な病理的症状を呈さないが、成長が遅いことが知られている。また、実験的に複数のストレスを負荷した動物の成長は著しく遅く、動物生産に重要な筋肉の損失も起こることが実証されている。非病原菌、アンモニア、埃などは通常の飼育条件での成長低下には、飼料摂取量の減少を引き起こすだけではなく、熱によるエネルギー損失も伴い、効率的動物生産にはマイナスの要因である。免疫反応もエネルギーおよび栄養素を消費する反応であり、表2に示したように、獲得免疫に係わる免疫グロブリン合成よりも自然免疫に関連する急性期たんぱく質の合成により多くのエネルギーやアミノ酸が生産のために利用されなくなる。

表1　ストレスに対する反応

発熱・食欲不振・昏睡傾向
異化反応の亢進
血中インスリン・グルカゴン・
　コルチコステロン濃度の上昇
グルコース利用の増加
肝臓での急性期蛋白質生産増加
白血球増加
血中鉄・亜鉛濃度低下
血中銅濃度の増加
免疫機能の変化　　(Rosales 1994)

表2　成長中鶏における免疫反応、成長に要するリジン量の推定

	Cost μmol Lys/kg	
	対照	LPS challenged
白血球増殖	46	91
免疫グロブリン合成	66	70
急性期タンパク質合成	0	386
免疫反応のために必要量	111	547
% 免疫反応のために使用するLys	1.17	6.71
% 成長のために使用するLys	62.5	62.7

From Humphrey and Klasing., 2004

抗生物質の成長促進作用とその発現機構

抗病性獲得に主眼をおいた育種改良および免疫機能の適正な保持・活性化を考える上で重要な着眼点は、成長・生産を促進する抗生成長促進物質の作用機構を理解することである。一般的にブロイラーにおいて、半治療レベル量の抗生物質給与が成長・生産性を向上させる原因として、①有害微生物の排除、 ②微生物が利用する飼料由来栄養素の減少による宿主への栄養素供給の増加、 ③微生物によって生産される成長抑制物質の減少、 ④日和見感染によって引き起こされる免疫反応に対する代謝コストの削減などが考えられてきた。免疫システムは感染初期に働く自然免疫と、感染数日後から働く獲得免疫に分類され、相互に関わり合い、強力な免疫防御機構が構築される。自然免疫は、マクロファージやナチュラルキラー（NK）細胞、多核白血球などのリンパ骨髄系細胞と、補体を

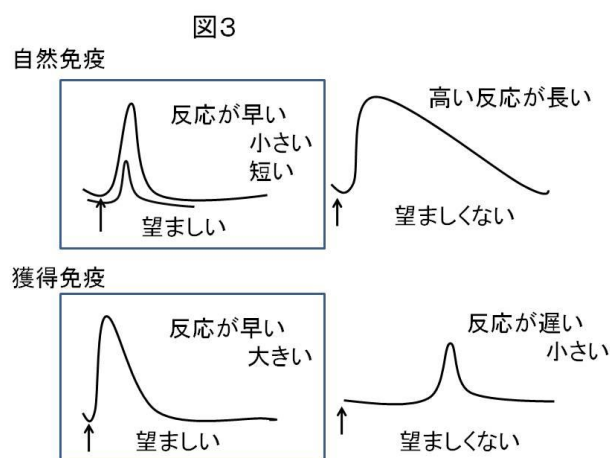
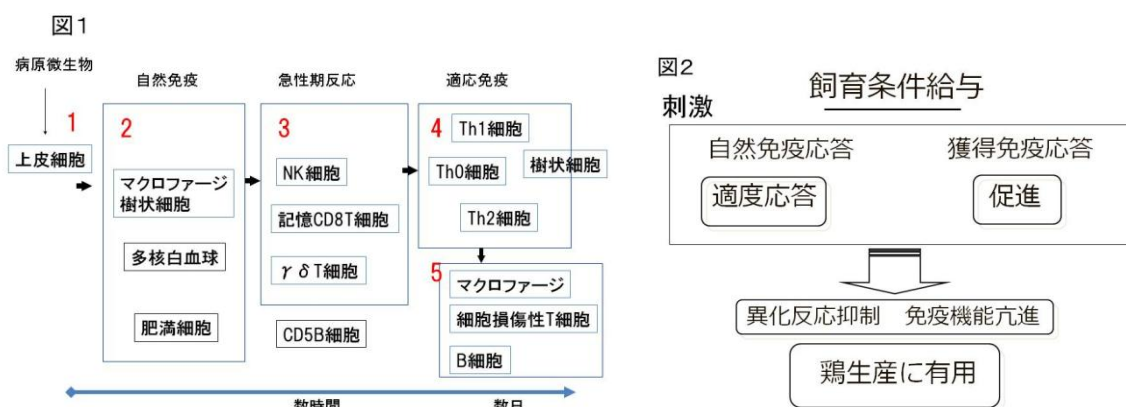
はじめとした液性因子によって構成される抗原非特異的な防御機構である。獲得免疫は、T 細胞、B 細胞や抗体を中心とした抗原特異的な防御免疫であり、抗原排除後も記憶 T、B 細胞の出現により、持続性のある感染防御機構を担う。これら免疫細胞の相互の関係により外来抗原によるストレスを緩和している（図1）。したがって、自然免疫の適度の応答と獲得免疫の促進は、栄養素の生産への分配の増加と抗病性の増強が、無抗菌剤飼育には重要と考えられる（図2）。図3には、望ましい自然免疫と獲得免疫応答の概念図を示した。すなわち、自然免疫は刺激に対する応答がはやいこと、そして、反応は長く続かないことが望ましい。自然免疫応答が長く続くことは栄養素の生産への分配が少なくなることから望ましくない。刺激に対する獲得免疫はできるだけはやく起こりある程度大きいことが望ましい。後述する免疫指標の適切な反応も図3の原則に則り評価されることになる。

抗生物質代替方法検索における免疫指標の利用

表３から表５には本分科会での免疫関連指標の選択過程をまとめている。表３は飼育施設では、
多くの動物はと殺できないこと、高価な分析装置はないことなどを前提にどのようなことを考慮したかを簡単にまとめた。表4には、実験室で著者が使用していた（いる）免疫関連指標と獲得および自然免疫の分類を示している。表5は、アメリカの研究者が提唱していた抗病性評価のための免疫指標と自然および獲得免疫との関連、そして現場での利用可能性を示している。これらを基に分科会が取りまとめた無抗菌剤飼育に資する免疫指標を表6に記した。これらに他の指標を組み合わせると、その精度は高まると考えられる。

表3

生産現場での使用条件

非破壊的な試料採取
容易な試料採取

比較的鋭敏な反応
持続な反応

測定が安価で容易

表4

免疫機能の評価法

カテゴリー	測定
獲得免疫	抗体産生活性 T細胞の数と亜集団の構成 細胞増殖活性
自然免疫	急性期反応活性 マクロファージ活性
情報伝達	サイトカイン

表5

生産現場での免疫機能評価法の実用性

	測定法	現時点での適応性
獲得免疫	抗体産生細胞の測定	○
T細胞依存性の反応	皮膚反応	○
T細胞の状態	T細胞の数と亜集団の構成比	×
自然免疫機能	NK細胞活性	△
	マクロファージの活性	○
その他	リンパ系の器官の重量	

表6

分科会で選定した免疫指標

	自然免疫	獲得免疫
破壊的	免疫担当臓器重量	免疫担当臓器重量
非破壊的	○HL比 ○マクロファージ機能（走化性、貪食能、化学発光、NO） ○急性期たんぱく質（セルロプラズミン、酸性糖タンパク質）	○免疫グロブリン濃度（IgA、IgG） ○遅延型過敏症 ○抗原特異的抗体価（SRBC、BM、ND）

本講演では、分科会で選定した免疫指標の使用例をあげ、その有用性と改良すべき点などを述べてみたい。

分析手法名：化学発光法による貪食細胞殺菌能の測定

所属名　道総研　畜産試験場

1）準備するもの

分類	品名	会社	数量	単価	備考
試薬	5mM Hepes-Eagles's MEM	ニッスイ	100g入	4000円	
	L-glutamine（特級）	Wako	25g	1300円	
	$NaHCO_3$	Wako	500g	3300円	
	トリエチルアミン	Wako	25ml	900円	
	NaCl	Wako	500g	800円	
	Luminol	片山化学	5g入	4500円	
	Zymosan A	SIGMA	250g入	5600円	
	PBS(-)	Wako	500ml		
	ミリポアフィルター				
消耗品	ベノジェクトII　真空採血管（滅菌品）	TERUMO	100本入		採血用
（参考）	テルモ注射針（19G×$1_{1/2}$"　ガンマ滅菌済）	TERUMO	100本入	870円	採血用
	ニプロシリンジ（1ml、針ナシ）	NIPRO	100本入	2600円	採血用

注 1）ALOKA 社製 LUMINESCENCE READER（化学発光測定装置）を使用して分析

注 2）その他、遠心分離機、マイクロピペットなど

2)分析手法

（1）試薬の作成

①5mM Hepes-Eagle's MEM（E-MEM)の調整

Eagle'sMEM9.4g と L-glutamine0.292g を DW1000ml に溶かす

↓

10% $NaHCO_3$ で pH7.4 に合わせる($NaHCO_3$ 約 20ml 滴下で約 pH7.4)

↓

0.45μ m のフィルターで濾過滅菌する

↓

分注して-20℃で保存。

②ルミノール液の調整

Luminol 50mg とトリエチルアミン 25μ l を DW25μ l に溶かす

↓

約 50℃の湯槽で超音波処理（15min×3 回）する

↓

0.45μ m のフィルターで濾過滅菌する

↓

分注して保存（-20℃）

③ザイモザンの調整

ZymosanA 100mg を 0.15MNaCl 10ml に溶かす

↓

煮沸（100℃で 10min）

↓

PBS(-)で 2 回洗浄・遠心分離（2000rpm で 10min）する

↓

沈殿に新鮮血清 1ml を加える

↓

オプソニン化（37℃、30min）

↓

遠心(3000rpm で 10 分）して沈殿を回収

↓

PBS(-)で 2 回洗浄(2000rpm で 10 分）する。5mM Hepes-Eagle's MEM10ml に沈殿 100mg を懸濁し、分注して-20℃で保存。

（2）測定

①静脈血を採血（ヘパリン加）

↓

②測定用専用チューブ内で静脈血を 50μ l を、解凍した E-MEM を 450μ l、ルミノール液 10μ l、ザイモザン 10μ l と混和し、速やかに装置にセットする

↓

③直ちに測定を開始し、蛍光の増加を経時的に記録し、ザイモザン貪食による発光量を 30 分間測定する。

↓

④別途マクロファージ数を数える。

↓

⑤30 分間の発光量をマクロファージ 1000 個当たりに換算して算出。

3) 参考文献

「マクロファージ実験マニュアル」 徳永徹他　講談社

分析手法名：セルロプラスミン濃度
（炎症時に急増する。ジアミンの酸化活性を測定する。）

所属名　山梨県畜産試験場

1）準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
酢酸	関東化学	1	1,030	500g
酢酸ナトリウム	関東化学	1	1,310	500g
アジ化ナトリウム	関東化学	1	2,760	100g
パラニトロフェニレンジアミン	関東化学	1	2,380	25g
試験管				

注）価格は税込み　当場購入価格

・試薬の調整

・0.1M 酢酸緩衝液（pH5.4）

・1.5M アジ化ナトリウム溶液

・27mM　パラニトロフェニレンジアミン(A)

またはパラニトロフェニレンジアミン 0.5g を 0.1M 酢酸緩衝液 100ml で溶解。

（不安定なので3時間以内に分析を終了する）

※　0.5gパラニトロフェニレンジアミンを100mlにしても27mMにならない。原著は27mMであるが、いずれの濃度でも測定可能。

・分光光度計

2）分析方法

①0.1M 酢酸緩衝液　2ml を2つのチューブ（blank and reaction）に入れる。

②0.1ml の血漿（血清）を加える。

③37℃の温水浴中で5分間加温

④同時に加温したAを 1ml 加える。

⑤5分後、ブランクチューブに 50μl のアジ化ナトリウム溶液を加える。

⑥正確に30分後、リアクションチューブに 50μl のアジ化ナトリウム溶液を加える。

530nm で吸光度測定

※アジ化ナトリウムは金属製管内で爆発性化合物を形成することがあるので注意。

3）判定方法

セルロプラスミン濃度（g／l）＝0.752×（$A_R - A_B$）

4)参考文献

Matsushita K. Takahashi K. : Effect of Adequate or Marginal Excess of Dietary Methionine Hydroxy Analogue Free Acid on Growth Performance, Edible Meat Yields and Inflammatory Response in Female Broiler chickens. J.Poult. Sci. 44 (2007)

Matsushita K. Takahashi K. : Effect of Dietary Protein Source and Antibacterial Agent on Growth Performance, Edible Meat Yield and Certain Stress Response in Female Broiler Chickens. J. Poult Sci. 41 (2004)

Shimosato F.: Studies of analytical methods for ceruloplasmin in Serum. 1. A comparison of the ferrous oxidase reaction and the diamine oxidase reaction in quantitative determination of serum ceruloplasmin. Shinshu. unv.(1984)

Sunderman FW Jr. Nomoto S. : Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. Clinical Chemical 16 (1970)

分析手法名：α 1酸性糖タンパク質濃度
（感染症などに罹患した場合に急増する急性期蛋白質）

所属名　山梨県畜産試験場

1）準備するもの：

試薬・消耗品	製造会社名	数量	価格	備考
ニワトリα 1AG プレートキット	ニコス研究所	1	47,250	100 検体
マイクロシリンジ				5μ l

注）価格は税込み　 当場購入価格

2）分析手法

ア）検量線の作成

①キットに同梱の基準液AとBを5μ lずつ別々の注入穴に入れる。

②プレートにカバーをして水平状態（水飽和状態で、タッパに水を張ることで可能）、37℃、48時間反応させる。

③プレートのカバーを外し、ヒナ白痢の測定盤上で沈降リングの直径を測定する。

イ）濃度の測定

①検体を5μ l注入穴に入れる。

②プレートにカバーをして水平状態（水飽和状態で、タッパに水を張ることで可能）、37℃、48時間反応させる。

③プレートのカバーを外し、ヒナ白痢の測定盤上で沈降リングの直径を測定する。

※注意：①検体量が少量なので、マイクロシリンジを利用する場合は生食で洗浄し、数回試料で共洗いをして注入する。

②キットは凍結不可

3）判定方法

①検量線を作成し、各検体の濃度は検量線から求める。

4）参考文献

Matsushita K. Takahashi K. : Effect of Adequate or Marginal Excess of Dietary Methionine Hydroxy Analogue Free Acid on Growth Performance, Edible Meat Yealds and Inflammatory Response in Female Broiler chickens. J.Poult. Sci. 44 (2007)

分析手法名：SRBC、BM 抗体価測定

所属名　静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター

◎概略

液性免疫を評価する指標の一つ。T 細胞依存性液性免疫の評価として、ヒツジ赤血球（Sheep Red Blood Cell)を、T 細胞非依存性液性免疫の評価として、ブルセラ・メリテンシス死菌をそれぞれ抗原として利用し、これらをニワトリへ接種した際の抗体の上昇値を計測する。

1）準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
ヒツジ脱線血	日本生物材料	50ml／本	3300 円／本	
ブルセラ病急速診断用菌液	化血研	5ml／本	4500 円／本	
滅菌生理食塩水				研究室で調整
滅菌 PBS				研究室で調整
牛血清アルブミン（BSA）	wako	5g	6000 円	
96 穴マイクロプレート(V 底)	アズワン	50 枚／箱	16500 円／箱	
採血用針付きシリンジ（2.5ml）	テルモ	100 本/箱	2400 円／箱	
注射用針付きシリンジ（1ml）	テルモ	100 本／箱	2400 円／箱	

2）分析方法

＜事前準備（接種日または前日に実施すること）＞

（1）10%ヒツジ赤血球液の調整（必要量：0.05ml／羽　2 倍以上は作ること）

①　羊脱線血を遠心分離（2000～2500rpm　20 分）

②　上清をすて、滅菌生理食塩水を適当量入れてよく混和する（洗浄）。

③　①、②を 3 回繰り返す。

④　上清をピペットで丁寧に捨てた後、血球を 1（x）ml とる。

⑤　9ml（xの 9 倍量）の生理食塩水と混和する。

（2）2%BA 菌液の調整

①　市販 BA 診断液を遠心（2000～2500rpm　20 分）

②　上清をピペットで丁寧に捨てたあと、菌を 200μｌとる。

③　②に 49 倍量（200μｌの場合 9.8ml）の生理食塩水と混和する。

（3）接種液の調整

（1）と（2）を等量ずつ混和し、必要量の約倍量を調整する。

＜本試験＞

（4）抗原感作

① ブロイラー：21 日齢、28 日齢で接種液を 0.1ml／羽　静脈注射する。この際、まずは検査用の血液を採取してから接種すること。その後、毎週採血を行う。

地鶏：4 週齢、5 週齢時に接種液を静脈注射。その後一週間毎に採血する。

② 採血後、血清を分離。すぐに検査をしない場合は−80℃で冷凍保存。

③ 検査準備が整ったら解凍して本検査を実施。

（5）抗体検査

① 事前準備：2％SRBC および 10%BA 菌液の調整。上記を参考にして作成。必要量の 2 倍は作ること。（参考：それぞれプレート 1 枚あたり 2.4ml 必要）

② 事前準備2：希釈液の作成。希釈液は 0.05%BSA 加 PBS

※　必要量は検体数から算出すること（参考：プレート1枚あたり 2.4ml 必要）

③ 全穴に希釈液を 25μｌずつ滴下する

④ 1 列目にサンプル（血清）を 25μｌ添加し、12 列目まで段階希釈して最終列は 25μｌ捨てる

⑤ 全穴に 2%SRBC（10%BA）を滴下

⑥ 37℃1 時間静置（BA の場合は 1 日静置）

⑦ 判定（50%凝集を示した希釈倍率の対数（底2）を抗体価とする）

分析手法名：鶏ニューカッスル病(ND)抗体検査―赤血球凝集抑制(HI)反応―

所属名　静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター

◎概略

ウイルスの多くはいずれかの動物の血球を凝集する能力を持っている。その血球凝集能は特異性があるので、抗体と結びつくと失われる。この性質を利用して、血清とウイルスの反応後の凝集の有無により、被検血清中の抗体保有状況を調査する。

1）準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
NDV 赤血球凝集素	化血研	1ml×5本／箱	4500円／箱	
96穴マイクロプレート（U底）	アズワン	50枚／箱	16500円／箱	
生理食塩水				研究室で調整
ニワトリ血液	日本生物材料	50ml／本	5000円／本	自己採取する場合 ND ワクチン未接種鶏が望ましい

2)分析方法

＜試験の流れ＞

＜検査方法＞

① 鶏(又はガチョウ)赤血球の調整

生理食塩水で3回洗浄(2,500 rpm、10分間)

↓

沈さ（packed cell)を生理食塩水で0.5%濃度の赤血球浮遊液に調製

② 第一次抗原検定(赤血球凝集素又は抗原のHA性測定)

溶解した市販抗原を生理食塩水で500倍に希釈する（試験管内）。

生食　0.9ml　0.9　0.8

)＼　)＼　)＼ステル

抗原　0.1ml　0.1　0.2

その後マイクロプレートを用いて下記反応を行う。

No.	1	2	3	4	5	6
抗原希釈倍数	1000	2000	4000	8000	16000	対照
生理食塩水	50μ	50	50	50	50	50
	)	)	)	)	)	
500倍抗原	50μ	50	50	50	50	ー
赤血球浮遊液	50μ	50	50	50	50	50
室温1時間静置						
判定	+	+	−	−	−	−

※判定は HA 性の確認であるので、マイクロプレート底部に赤血球が完全凝集しているものを陽性とする。

※第一次抗原検定で完全凝集を示した力価の 8 単位を本試験で使用するので、上述希釈倍数 2,000 倍で完全凝集した場合は 2,000÷ 8＝250 となり、凝集素を 250 倍希釈して用いる。

③本試験（マイクロプレート法）

次表のとおり、血清を生理食塩水で段階希釈する。

No.	1	2	3	···············	10	11	12	13		14
血清希釈倍数	2	4	8		1024	2048	4096	8192		対照
生理食塩水	25μｌ	25	25	···············	25	25	25	25		25
	）	）	）		）	）	）	）		
血清	25	25	25		25	25	25	25	ステル	25
抗原（8単位）	25	25	25	···············	25	25	25	25		
赤血球浮遊液	50	50	50	···············	50	50	50	50		50
判定	－	－	－	···············	－	＋	＋	＋		－

※判定は上記では抗体価 1024 倍であるが、マイクロプレートを 45 度に傾斜させて観察することで、底部の血球が流れ出る場合は、血球が凝集していないことの目安となる。

※血清希釈倍数は完全凝集が最高希釈倍数より高くでた場合は、より高い end titer まで測定する必要がある。

④第 2 次抗原検定（本試験と同時実施）

抗原使用量が 8 単位で使用されたことを確認する。次表のとおり、使用抗原を生理食塩水で段階希釈する。

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
抗原希釈倍数	1	2	4	8	16	32	64	対照
生理食塩水		25	25	25	25	25	25	25
		）	）	）	）	）	）	
500倍抗原	25μｌ	25	25	25	25	25	25	
赤血球浮遊液	50	50	50	50	50	50	50	50
室温1時間静置								
判定	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－

※8 単位からずれた場合は、本試験の結果を検定結果から補正する

（参考図書：静岡県産業部畜産振興室　家畜衛生マニュアル（H17改訂））

分析手法名：遅延型過敏反応（肉垂皮内反応）

所属名　三重県畜産研究所

1）　準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
ヒューマン・γ ・グロブリン（G-4386）	シグマ社	1g	9,450	
アジュバンド・コンプリート・フロインド	ディフコ社	10ml×6本/ 箱	9,520	
テルモ注射針,18G×11/2	テルモ株式会社	100 本/箱	390	
1ml、ツベルクリン用、テルモシリンジ	テルモ株式会社	100 本/箱	1,390	
マイジェクター注射針付シリンジ、インスリン用1ml（100 単位/ml）、29G×1/2	テルモ株式会社	280 本/箱	6,000	
塩化ナトリウム （特級）	関東化学株式会社	500g	640	
50ml Centrifuge Tube(遠心管）	岩城硝子株式会社	300 本/箱	23,560	

注）価格は税抜き、当場購入価格。H21 年 5 月現在

分析機器として以下の機器を用いる。

- ボルテックス
- デジタル表示のノギス
- 蒸留水精製機
- オートクレーブ

2）分析方法

・前感作

①遠心管に滅菌生理食塩水1 mlあたりヒューマン・γ ・グロブリン400μ g を溶かし、次に等量のアジュバンド・コンプリート・フロインドを遠心管の壁に滴下しながら混合し、ボルテックスで十分に撹拌する（約 10 分間で白濁懸濁化する）。

②1羽あたり、①で作成した液を合計 1ml 筋肉内に接種する。

具体的な接種部位として、胸筋と大腿筋の左右計4カ所に 0.25ml ずつ接種する。

・本感作

① 感作から2週間後に行う。

② 種前に、左右の肉垂の接種部位の厚さを、デジタル表示のノギスで測定する。

③ 滅菌生理食塩水1 ml あたりヒューマン・γ ・グロブリン400μ g を溶かした液0.1ml を左の肉垂に、滅菌生理食塩水0.1ml を右の肉垂に皮内接種する。

3）判定方法：

① 24時間および48時間後に左右の肉垂の接種部位の厚さをデジタル表示のノギスで測定する。

② 腫脹差＝（接種後の左肉垂の厚さー接種前の左肉垂の厚さ）ー（接種後の右肉垂の厚さー接種前の右肉垂の厚さ）

4）参考文献等

遅延型過敏反応測定の様子

あらかじめＨγＧを接種
（前感作）

→ 2W後

肉垂への皮内接種
（右：生理食塩水）
（左：ＨγＧ・・・本感作）

→

ノギスを用いて時間毎に
左右の肉垂の腫脹差を測定

左右肉垂の腫脹変化

分析手法名:H/L 比

所属名　三重県畜産研究所

1）準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
MICRO SLIDE GLASS (S-2111)	MATSUNAMI	100 枚/箱	2,890	
鑑別用血液染色液:ディフ・クイック	シスメックス株式会社	500ml×3 本/ 箱	8,080	使用期限あり
テルモシリンジ注射針付、2.5ml、23G×1	テルモ株式会社	100 本/箱	1,250	
IMMERSION OIL FOR MICROSCOPY	オリンパス株式会社	50cc/本	3,000	

注)価格は税抜き、当場購入価格。H22 年 5 月現在。

分析機器として以下の機器を用いる。

・ 光学顕微鏡

2）分析方法

① 採血後、すぐにスライドグラスにて血液塗沫を行う。

② スライドをディフ・クイック固定液の中で 1 秒間1回の割合で 5 回浸す。スライドについた余分のディフ・クイック固定液はふり切る。

③ スライドをディフ・クイック染色液Ⅰの中で 1 秒間1回の割合で 5 回浸す。スライドについた余分のディフ・クイック染色液Ⅰはふり切る。

④ スライドをディフ・クイック染色液Ⅱの中で 1 秒間1回の割合で 5 回浸す。スライドについた余分のディフ・クイック染色液Ⅱはふり切る。

⑤ 精製水にてスライドグラスを洗い、風乾する。

⑥ 光学顕微鏡の油浸レンズにて白血球の百分率を測定する。

3)判定方法:

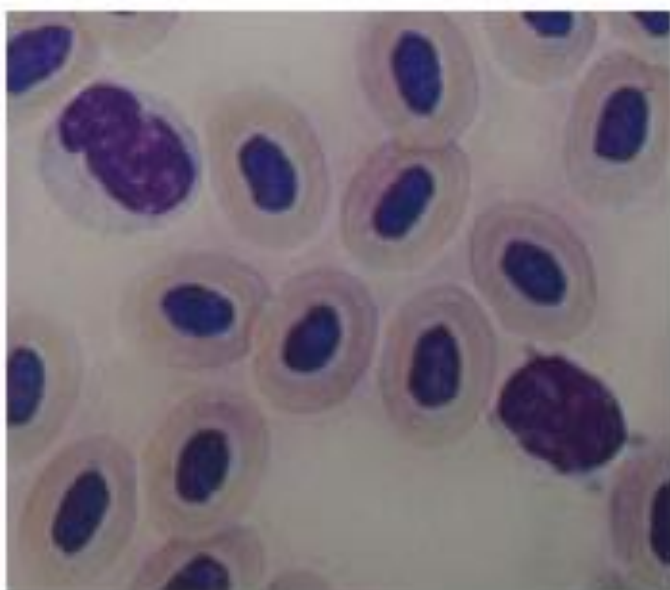
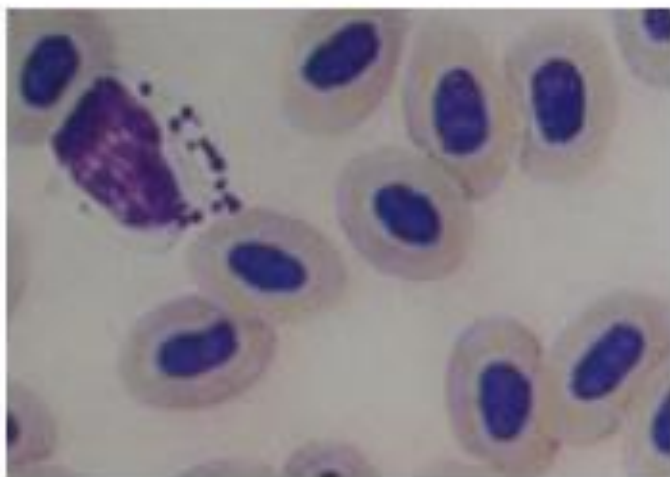
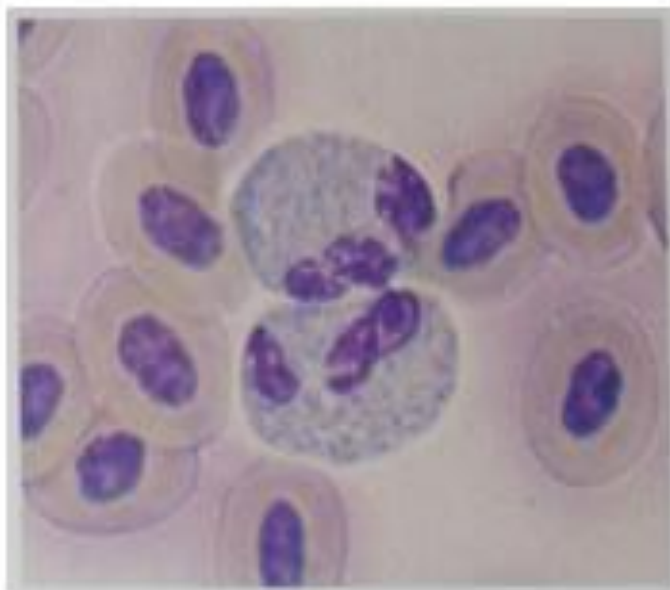
偽好酸球/リンパ球を計測する。

4)参考文献等

・家畜血液図説、家畜血液図説編集委員会、チクサン出版社

・鶏病診断、堀内貞治、家の光協会

・鳥の血液細胞診検査マニュアル、梶ケ谷博、インターズー・前感作

H/L比（偽好酸球/リンパ球）のカウント

リンパ球（右上、左下）

大リンパ球（右上）
（アズール顆粒含む）.

偽好酸球（中央）

分析手法名：胸腺・脾臓・ファブリキウス嚢の生体重との重量比

所属名　三重県畜産研究所

1）準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
解剖はさみ （No7）	富士平工業株式会社	1 本	2,470	
滅菌シャーレ （SH90-15）	株式会社 イナオプティカ	500 枚／ 箱	9,000	

注）価格は税抜き、当場購入価格。H21 年 5 月現在。

分析機器として以下の機器を用いる。

・　電子上皿天秤

・ 鶏体重はかり

2）分析方法

①鶏の生体重を測定する。

②と殺後、胸腺・脾臓・ファブリキウス嚢を分離し、各々の重量を測定する。

3）判定方法：

胸腺・脾臓・ファブリキウス嚢の各重量/生体重を算出する。

4）参考文献等

各臓器の位置
胸腺：頸部に沿う様に左右に分布
（ピンク色）
脾臓：胆嚢の横に存在（暗赤色）
ファブリキウス嚢：総排泄腔近く
に存在（乳白色、薄ピンク）

分析手法名：マクロファージ活性評価方法（走化性、貪食能）

所属名：京都府農林水産技術センター　畜産センター

1）　準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
ﾀﾞﾙﾍﾞｯｺ変法イーグﾙ培地ＤＭＥＭ（4.5g/L ｸﾞﾙｺｰｽ）	ﾅｶﾗｲﾃｽｸ	500ml	1,500	
ﾍﾟﾆｼﾘﾝｰｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ混合溶液	ﾅｶﾗｲﾃｽｸ	100ml	3,700	DMEM 培地 500ml ×20 本分
モノ・ポリ分離液	大日本製薬	100ml	12,000	14 検体分（2 反復）
Latex beads,polystyrene(1.1μ m)	SIGMA	1ml	10,600	
ｺﾆｶﾙﾁｭｰﾌﾞ 15ml（ﾎﾟﾘﾌﾟﾛﾋﾟﾚﾝ）	ﾌｧﾙｺﾝ	500 本	28,500	
ﾗﾌﾞﾃｯｸⅡﾁｪﾝﾊﾞｰｽﾗｲﾄﾞ　8 ウエﾙ	ﾅﾙｼﾞｪﾇﾝｸ	16 枚	12,960	64 検体分（2 反復）
標本用封入剤　MGK-S	松浪硝子工業	100ml	1,500	
ﾏﾙﾁｳｪﾙｾﾙｶﾙﾁｬｰﾌﾟﾚｰﾄ　ﾌﾀ付き 24 ｳｪﾙ	ﾌｧﾙｺﾝ	50 枚	28,300	12 検体／枚（2 反復）
ケモタキセル　5μ	ｸﾗﾎﾞｳ	100 個	30,000	
ケモタキセル膜専用カッター			1,900	
ﾅﾙｹﾞﾝ梨型遠沈管（PC 製）10ml	ﾅﾙｼﾞｪﾇﾝｸ	10 本	9,500	洗浄、再利用
ギムザ染色液	ﾅｶﾗｲﾃｽｸ	100ml	1,440	
ﾌﾞﾚｲﾝﾊｰﾄｲﾝﾌｭｰｼﾞｮﾝﾌﾞｲﾖﾝ「ﾀﾞｲｺﾞ」	日本製薬(株)	300g	6,000	
パスツールピペット　5 インチ	ｲﾜｷ	200 本	1,800	
スライドガラス（水切放ﾌﾛｽﾄ）	ﾏﾂﾅﾐ	100 枚	1,370	
カバーガラス（18×18）	ﾏﾂﾅﾐ	100 枚	410	
走化性因子（*Escherichia coli* k-12）	NBRC		4,200	
血球計算盤				何でも可
メタノール				細胞固定用
ホルマリン				
PBS(－)				
生理的食塩水				
炭酸ガス				
5%CO_2 インキュベーター				
顕微鏡				
ドライヤー				

＊PBS(－)：Phosphate Buffered Saline

NaCl　8.0g　KCl　0.2g

Na_2HPO_4　1.15g　KH_2PO_4　0.2g　精製水を加えて 1L とする

＊ﾍﾟﾆｼﾘﾝｰｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ混合溶液は、一旦解凍して 5ml ずつ分注して凍結保存する。

＊DMEM(＋)：DMEM にﾍﾟﾆｼﾘﾝｰｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ混合溶液 5ml 添加したもの

2） 分析の手順

細胞液の調整

鶏全血

↓

モノ・ポリ分離液に重層

↓

遠心分離

↓

白血球層を分離・回収

↓

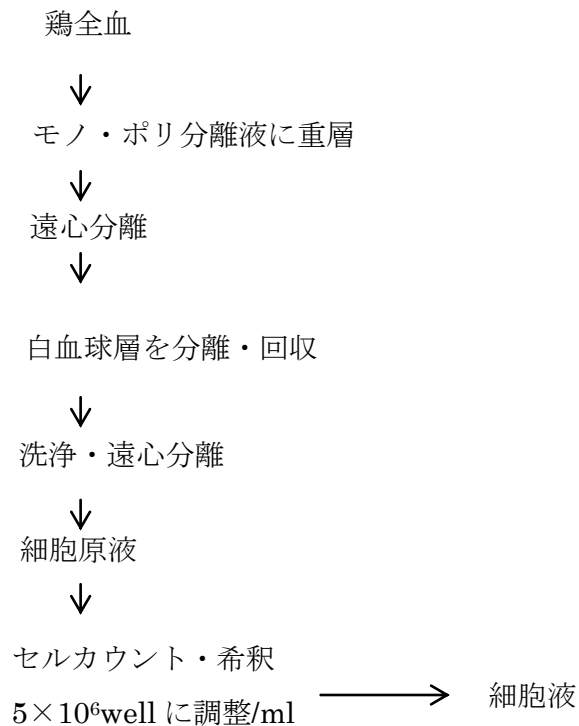
洗浄・遠心分離

↓

細胞原液

↓

セルカウント・希釈

5×10⁶well に調整/ml → 細胞液

保存ストック菌の作成

↓

走化性因子の調整（10mg/ml）

↓

マルチウエルプレートに

走化性因子を入れる

貪食活性

↓

チェンバースライドに

細胞液を入れる

↓

CO_2 インキュベーター 37℃一晩培養

↓

洗　浄

↓

ラテックスビーズを添加

↓

CO_2 インキュベーター

37℃ 1 時間　培養

↓

洗　浄

↓

固定、染色

↓

検　鏡

走化性

↓

ケモタキセルに

細胞液を入れる

↓

洗　浄

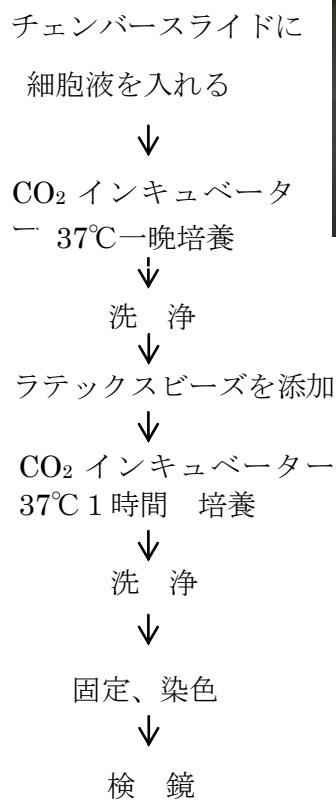
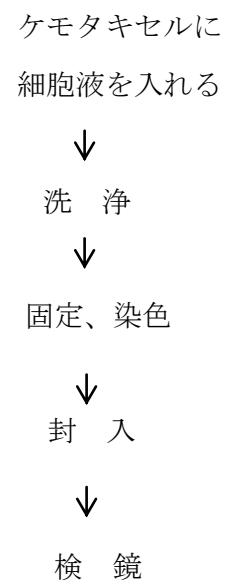
↓

固定、染色

↓

封　入

↓

検　鏡

3）分析手法

＜保存ストック菌の作製＞

① BHI ブイヨン 50ml に *E.coli* k−12　1ml（保存ストック菌）を添加する。

② 37℃、24 時間、振盪培養する。

③ 滅菌グリセリンを等量（50ml）加え、よく混合する。

④ 1ml ずつ分注して、−80℃で保存する。

＜走化性因子の調整＞

① BHI ブイヨン 50ml に E coli k−12　1ml(保存ストック菌)を添加する。

② 37℃、24 時間、振盪培養する。

③ 0.5%ホルマリン(BHI ブイヨン 50ml に対してホルマリン 0.25ml)を添加し、一夜室温で放置する。（完全に死菌にする）

④ 50ml 遠心管（空の重量を測定しておく）2 本に分注し、4000rpm、10 分、10℃で遠心分離を行い上清は捨て、沈渣を得る。

⑤ 適量の滅菌生理食塩水を加えて沈渣を浮遊させ、4000rpm、10 分、10℃で遠心分離を行い、上清を捨て沈渣を得る。この操作を 2 回繰り返しホルマリンを除去する。

⑥ 遠心管の重量を測定し、得られた沈渣量を算出する。（この時点で−80℃保存可）

⑦ 沈渣が 10mg/ml 濃度になるよう DMEM(+)培地を添加する。

⑧ 走化性因子は、使用するまで 37℃の CO_2 インキュベーターに入れておく。

＜細胞液の調整＞

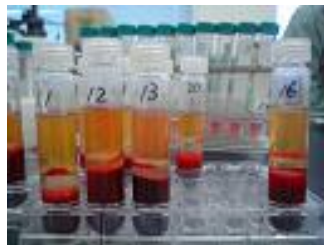
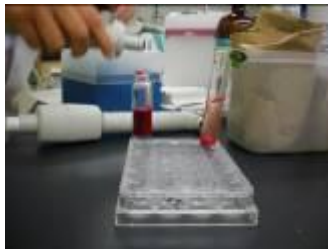
① 鶏全血約 4ml 採取（抗凝固剤：ヘパリン、EDTA 等）し、室温（15～30℃）で保存する。

② よく振り混ぜて均一化させたモノ・ポリ分離液 3.5ml をナルゲン梨型遠沈管に入れ、更に①を静かに重層する。

③ 1800rpm、20 分、15℃（15～30℃で良いが温度が高いと細胞が集塊を作り扱い難くなる）遠心分離を行う。

④ パスツールピペットでプラズマ層を除去する。

⇨

⇨

⑤ パスツールピペットで白血球層を回収し、予め DMEM(+)1ml を入れた 15ml コニカルチューブに移し、軽く攪拌する。

⑥ 1400rpm、10 分、15℃で遠心分離を行う。

⑦ 上清をデカンテーションで除去し、タッピング（指の爪でコニカルチューブを弾く）によりチューブ内に残った水分と細胞を混和させる。

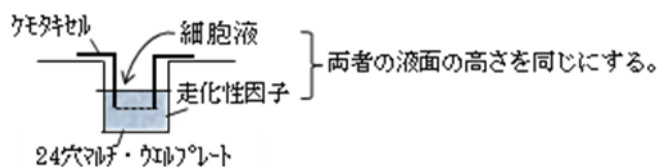
⑧ DMEM（+）を 1ml 加えて細胞を再浮遊（約 10^6cell/ml の単球を回収）させ、これを細胞原液とする。

⑨ 細胞原液の 100 倍希釈液（DMEM(+)1980μｌ＋細胞原液 20μｌ）を作成し、血球計算盤を用いて 5×10^6cell/ml になるようDMEM（+）で希釈する。これが走化性、貪食能に使用する細胞液となる。（細胞原液が 5×10^6cell/ml に満たない場合は、細胞原液をそのまま細胞液として使用する。）

＜走化性（ケモタキシスチャンバー法）＞

① 走化性因子（死菌重量 10mg/ml となるよう DMEM（+）を添加して用いる）を、

マルチウエルセルカルチープレートに 600μｌずつ分注する。（1 検体につき 2 穴使用）

② ①のプレートにケモタキセルを置き、細胞液を 200μｌ（＝1×10^6cell）分注する。

③ 5%CO_2 インキュベーター、37℃で一晩培養する。

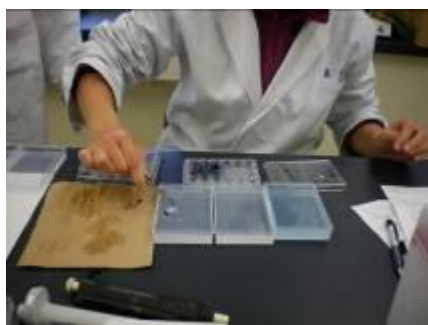
④ ケモタキセルを空のマルチウエルセルカルチャープレートに移す。このケモタキセルに適量のPBS(－)を分注し、ケモタキセルごと逆に向け PBS（－）を捨て、浮遊細胞を除去する。これを 3 回繰り返し、浮遊細胞を除去する。

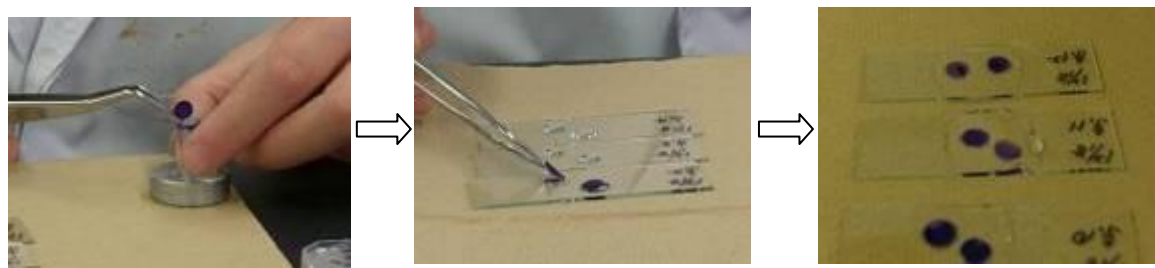
⑤ ケモタキセルを乾燥させる。（ドライヤー使用）

⑥ 冷メタノールを 500μｌ分注しておいたウエルにケモタキセルを移し、10 分間固定。

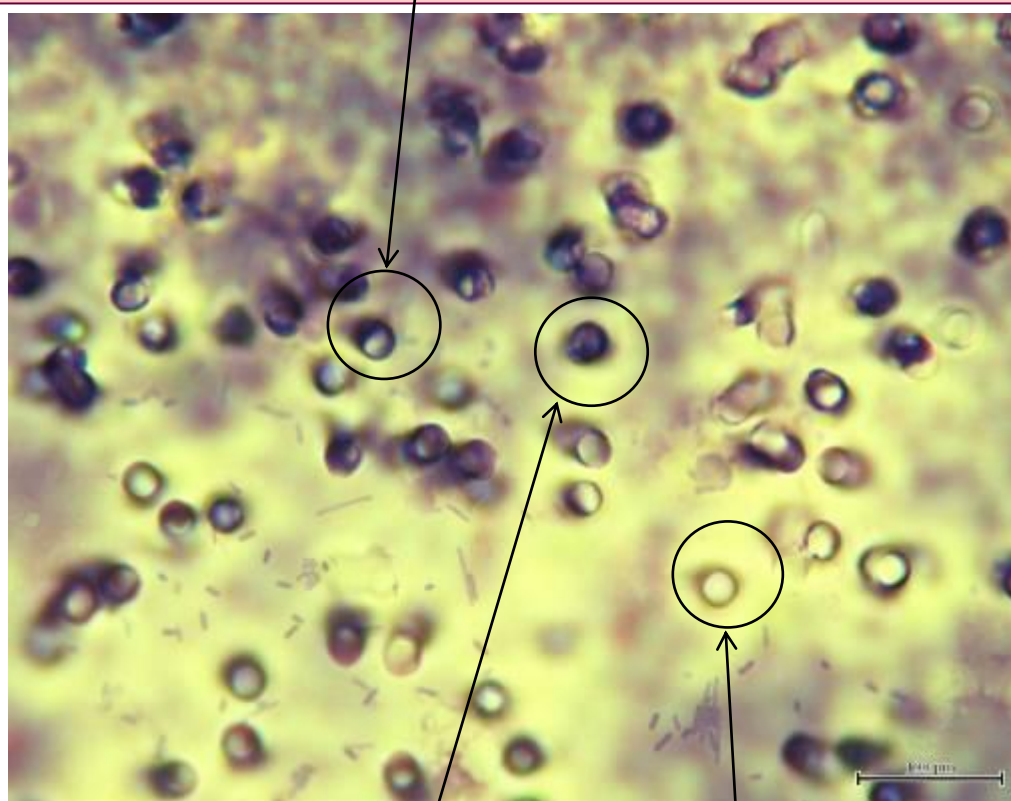
⑦ ギムザ染色液を 500μｌ分注しておいたウエルにケモタキセルを移し、15 分間染色。

⑧ 精製水を入れたシャーレを数枚用意し、ケモタキセルを洗い、乾燥する。（ドライヤー可）

⇨

⑨ ケモタキセル専用膜カッターで膜を外す。

⑩ スライドカラスに封入剤を 1～2 滴乗せ、その上に裏面を上にした膜を置き、気泡が入らないようにカバーガラスをかけて封入する。

⑪ 判定。顕微鏡（1000 倍）で観察すると、5μ 孔を通過中のマクロファージは孔全体が紫色に染色されているが、そうでない孔は透明である。視野中の全孔数及び、マクロファージが通過中の孔数を各々カウントし走化率を算出する。

走化率（%）＝視野中の染色された 5μ 孔数／視野中の 5μ 孔の全数×100

＜注意点＞
判定に悩む場合、例えば 5μ孔が均一に染色されていない場合カウントするのか？判定者が基準を決め、全ての区にその基準をあてはめて評価する。また、判定基準を一定にするため判定はひとりの目で行う。

マクロファージが通過中、細胞が染色されており 5μ孔が紫色に染まって見える。

5μ孔、何も通過していないので透明。

＜貪食活性（ラテックスビーズ法）＞

① ラブテックⅡチェンバースライドに細胞液を 200μｌ入れる。（n＝2）

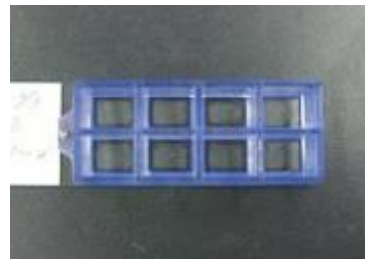
② 5%CO2 インキュベーター、37℃で一晩培養する。

③ 培養液を静かに捨て、DMEM(+)を適量加えて手で揺すりながら浮遊細胞を洗浄し、液を捨てる。この操作を 3 回行い、スライドガラスに付着した細胞をマクロファージとして実験に用いる。

④ ③に 0.03%ラテックスビーズ液（DMEM(+)12ml にラテックスビーズ 40μｌ）を 200μｌを分注する

⑤ 5%CO_2 インキュベーターで 37℃、1 時間培養する。

⑥ 適量の PBS(－)で余剰のラテックスビーズを洗浄する。洗浄は 5 回程度繰り返す。ビーズが残ると鏡検時に貪食反応と見間違うため、しっかり洗浄する）

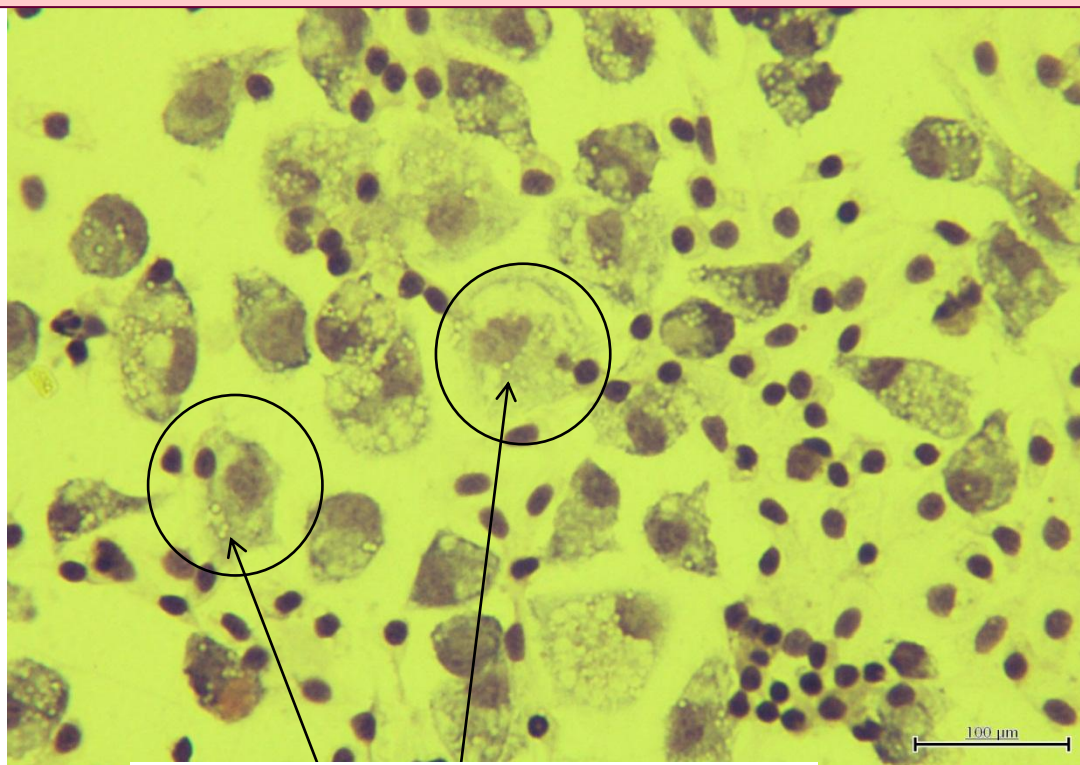
⑦ 風乾（ドライヤー使用可）する。

⑧ 冷メタノール 200μｌを入れて 1 時間固定する。

⑨ メタノールを捨て、ギムザ染色液を 300μｌ加えて 15 分間染色する。

⑩ 染色液を捨て、チェンバー部分を外して流水でスライドガラスを洗浄し、乾燥させる。

⑪ 判定。顕微鏡（1000 倍）で観察する。ランダムに視野を観察し、視野中のマクロファージ（単球）数及び、ビーズを 3 個以上食べているマクロファージ（単球）数をカウントし、貪食率を算出する。

$$\text{貪食率（\%）} = \frac{\text{ビーズを 3 個以上食べているマクロファージ（単球）数}}{\text{視野中のマクロファージ(単球)数}} \times 100$$

＜注意点＞
ビーズの貪食数は 3 個でなくてもよい。判定者が基準を決め、全ての区にその基準をあてはめて評価する。また、判定基準を一定にするため判定はひとりの目で行う。

マクロファージの細胞質に取り込まれたビーズ。

分析手法名 ： 血中IgA濃度測定

所属名：岡山県農林水産総合センター畜産研究所

1） 準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
BETHYL ELISA Quantitation Kit Chicken用 E30-103	BETHYL	1Kit	38,000	ｻﾝﾄﾞｲｯﾁELISAｷｯﾄ（補足用抗体、検出用HRP標識抗体、ｽﾀﾝﾀﾞｰﾄﾞ1ｷｯﾄ：1000ｳｪﾙ分）
ELISA Starter Accessory Package E101	BETHYL	1Kit	42,000	

注）マイクロプレートリーダー（波長 450nm）、インキュベーター20℃（反応用）

2）分析方法：

(1)ELISA Starter Accessory Package BETHYL E101 を使用し、溶液を準備する。

A1：Coating Buffer

A2：Wash Solution

A3：Postcoat Solution

A4：Sample/Conjugate Diluent

A5：Enzyme Substrate

A6：2N H2SO4

(2)Capture Antibody のコート

(3)ブロッキング

(4)スタンダードの作成

(5)HRP Detection Antibody の希釈調整

(6)Enzyme Substrate Reaction（酵素基質反応）

(7)マイクロプレートリーダーで測定（波長 450nm）

3）判定方法：

・測定値から標準曲線を作成し、サンプルの IgA値を求める

4）参考文献等

・BETHYL ELISA Quantitation Kit Chicken 用 E30-103 取扱説明書

・BETHYL ELISA Starter Accessory Package E101 取扱説明書

分析手法名 ： TBARS濃度蛍光法測定
（チオバルビツール酸反応陽性物質）
所属名：岡山県農林水産総合センター畜産研究所

１） 準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
氷酢酸（特級500ml）	ナカライテスク	１本	880	
2ーﾁｵﾊﾞﾙﾋﾞﾂｰﾙ酸(25g)	ナカライテスク	１本	4,600	
1,1,3,3ーﾃﾄﾗｴﾄｷｼﾌﾟﾛﾊﾟﾝ(25ml)	ナカライテスク	１本	2,350	
ﾒﾀﾉｰﾙ(特級500ml)	ナカライテスク	１本	650	
ﾘﾝﾀﾝｸﾞｽﾃﾝ酸Na(25g)	ナカライテスク	１本	2,000	
硫酸(特級500ml)	ナカライテスク	１本	850	
nーﾌﾞﾀﾉｰﾙ(特級500ml)	ナカライテスク	１本	1,000	
ねじ蓋付試験管(硬質ガラス製、直径16.5×長さ130mm、50本入り)	アズワン	１箱	7,000	

注）分析機器として以下の機器を用いる。
蛍光分光光度計、鍋（煮沸用）、遠心分離機、VortexMixer

試薬の調整

・0.67%TBA−酢酸試薬：

50%酢酸（特級の氷酢酸と蒸留水を1：1に混合）100ml に、0.67gの 2ーﾁｵﾊﾞﾙﾋﾞﾂｰﾙ酸を加える。

・STD 液（5nmol/ml ﾃﾄﾗｴﾄｷｼﾌﾟﾛﾊﾟﾝ水溶液）：

55mg の 1,1,3,3ーﾃﾄﾗｴﾄｷｼﾌﾟﾛﾊﾟﾝを秤量し、全量をメスフラスコ（50ml）に移し、50ml のﾒﾀﾉｰﾙ溶液（原液）とする。原液 0.1ml をメスフラスコ（100ml）に移し蒸留水を加えて 100ml の水溶液（使用液）とする。

・10%リンタングステン酸：

10gの特級ﾘﾝﾀﾝｸﾞｽﾃﾝ酸 Na に蒸留水を加えて 100ml とする。

・$N/12H_2SO_4$ ：

特級硫酸（36N）を蒸留水で希釈しN／12 に調整する。

・nーﾌﾞﾀﾉｰﾙ：

特級を使用する。

２）分析方法：

検量線

（1)STD 液 100μｌに H_20 3.9ml、 TBA−酢酸試薬 1.0ml を加え攪拌。

以下(6)以降の行程。

STD 液：5nmol/ml を希釈し、0.250、0.125、0.0625 を作成。

３点で検量線を描く。

サンプル（血清）

（1)試験管に 10%リンタングステン酸 0.5ml、N/12H_2SO_4 4.0ml、サンプル血清 20μｌを加え攪拌。

（2)5min 静置した後 3500rpm10min 遠心

（3)上清を除去し、N/12H_2SO_4 2.0ml、10%リンタングステン酸 0.3ml を加え攪拌。

※遠心により白沈殿が固くなっているので、よく攪拌！

（4)5min 静置した後 3500rpm10min 遠心

（5)上清を除去し、H_20 4.0ml、TBA−酢酸試薬 1.0ml を加え白沈殿を砕様に攪拌。

（6)沸騰水中で 60min 湯浴。

（7)流水で室温まで冷却。

（8)n−ブタノール 5.0ml を加え 2min 攪拌した後、3000rpm10min 遠心。

（9)蛍光分光光度計により測定

定量測定ﾓｰﾄﾞにより STD を描き、サンプルを測定。

励起波長 515nm　蛍光測定範囲 530−570nm

※553nm 付近のピークを読むと文献にはあるが、実際のピークは 550nm

３）判定方法：

・検量線を用いて、サンプル（血清）の TBARS 値を求める

４）参考文献等

・過酸化脂質実験法、金田・植田編、医歯薬出版社、1983

・脂質・酸化脂質分析法入門、宮澤・藤野編、学会出版センター2000

・酸化ストレスマーカー、二木・野口・内田編、学会出版センター2005

分析手法名 ： LPS刺激による試験

所属名：岡山県農林水産総合センター畜産研究所

1） 準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 L3129-100mg	シグマ	1本	20,400	
生理食塩水	大塚製薬	1本	100	

2）分析方法：

・Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 を滅菌生理食塩水に溶解し（500μ g／ml）、実験動物に投与する（500μ g／ml／kg）。

3）判定方法：

・LPS 投与後、事件動物の反応を観察する。

4）参考文献等

・K.Takahashi,T.Mashiko and Y.Akiba

Effect of Dietary Concentration of Xylitol on Growth in Male Broi- ler Chicks During Immunological Stress

Poultry Science 79:743-747,2000

・K.Takahasi,Y.Akiba and K.Tamura

Effect of Repeated Sephadex Injection with or without *Escherichia coli* Lipopoiysaccharide on Growth, Immunocompetent Organ Weight and Plasma Alpha 1 Acid Glycoprotein Concentration in Broiler Chicks Reared in Different Stocking Density

Anim.Sci.J. 71(3):268-273,2000

分析手法名：NO（一酸化窒素）産生能測定法

所属名　佐賀県畜産試験場

１）　準備するもの

試薬・消耗品	製造会社	数量	価格	備考
バイエルアスピレーター	バイエルメディカル社	100 本	21,000	ヘパリン加シリンジで代替加
コニカルチューブ 15ml	ファルコン	500 本	28,500	
Ficool paque	Amersham Biosiences	100ml×6	33,000	
RPMI-1640 液体培地	SIGMA	500ml	630	
滅菌ラックボックス（200μl）	アシスト	96 本/箱×10	8,800	
滅菌 Long tip（1000μl）	アイビス	96 本/箱×10	15,000	
Chicken Serum	Invitrogen	500ml	23,500	
FBS	Hyclone	500ml	52,800	
ペニシリン・ストレプトマイシン・グルタミン液体	Invitrogen	100ml	3,780	
血球計算盤（Burker-Turk）	アズワン	1個	9,000	WATSON より使い捨てタイプも販売
48well plate	ファルコン	50	13,900	
96well plate	ファルコン	50	10,500	
マイクロチューブ	アズワン	500	1,800	
トリパンブルー	ナカライテスク	25g	3,500	
リン酸	ナカライテスク	500ml	900	
N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩	ナカライテスク	5g	3,400	
Sulfanil amid	SIGMA	100g	3,000	
亜硝酸ナトリウム	ナカライテスク	500g	1,130	

注）価格は税抜き、当場購入価格。

分析機器として以下の機器を用いる。

- プレートミキサー
- プレートリーダー（550nm の測定が可能なフィルター）

培養に際しては、5%CO2 インキュベータを用いる。

2）分析方法

Chick PBMC(peripheral blood mononuclear cell：抹消血単核球)の調整

採血（ヘパリン加血液）

↓転倒混和

7ml の RPMI−1640medium の入った 15ml コニカルチューブにヘパリン加血液を移す

↓転倒混和

↓2.5ml の Ficool paque の入った 15ml コニカルチューブに希釈した血液をのせる。

↓遠心分離　2000rpm 10min. at 20℃

PBMC を回収→5ml の RPMI−1640medium の入った別の 15ml コニカルチューブに移す。その後転倒混和。

↓遠心分離　1000rpm 7min. at 4℃

沈殿　上清は捨てる。

↓タッピングにより沈殿をほぐす

冷えた 5ml の RPMI−1640medium を加え、懸濁する。

↓遠心分離　1000rpm 7min. at 4℃

沈殿　上清は捨てる。

↓タッピングにより沈殿をほぐす

冷えた 5ml の RPMI−1640medium を加え、懸濁する。

↓遠心分離　1000rpm 7min. at 4℃

沈殿　上清は捨てる。

↓タッピングにより沈殿をほぐす

冷えた 2.2ml（733μｌ×3）の 1%Chicken serum、10%FBS、1%ペニシリン・ストレプトマイシン・グルタミン液　RPMI−1640medium を加え、懸濁する。

（抗生物質を添加することで培養中のコンタミを防止）

↓cell count(計算盤は Burker−Turk Type で使い捨ても市販されている)

ふた付きチューブに 0.2ml を入れる（2.0ml 入ったチューブは必ず冷やしておく）。ふた部分に 0.3%トリパンブルーPBS を入れて 1:1 で混合して算出する（死菌は核が青色に着色される。Count しない）。

↓Cell Count の結果に基づき 2.0×107cells/ml に希釈する。

Chick PBMC　2.0×10^7cells/ml

↓200μｌ/well の割合で 48well plate に細胞を播種する。Well には予め 200μｌの培地。

Chick PBMC　4.0×10^6cells/ml

↓刺激群：刺激剤の添加→サルモネラ死菌体菌液　5.0μＬを添加

↓非刺激群：5.0μＬの培地を添加

20h　5%CO2 インキュベーター内で培養　培養液 35μＬサンプリング→NO　assay

NO assay

材料及び方法

サンプル：培養液

Nitrite（亜硝酸ナトリウム）標準液：4℃保存の 200μ M の標準液を用いて用事調整

Griess 試薬：4℃保存

Griess1：7.5%phosphoric acid、1.0%sulfanil amid DW

Griess2：0.3%ナフチルエチレンジアミン　DW

用事 1 と 2 を 1:2 に混合して使用する。

96well plate（平底）

マイクロピペット、チップ、プレートミキサー

プレートリーダー（550nm の測定が可能なフィルター）

操作

1）　回収した培養液 35μ L を 96well plate に移す。

2）　Nitrite 標準液の希釈

	0(μ M)	5(μ M)	10(μ M)	20(μ M)	35(μ M)	70(μ M)
200μ M Nitrite	0	2.5	5.0	10.0	17.5	35μ L
DW	100	97.5	95.0	90.0	82.5	65μ L

3）　Nitrite 標準液を 35μ L づつ assay 用の well に移す。

4）　Griess 試薬の混合。Griess1　と Griess2 を 1:2 で混合する。

5）　Nitrite 標準液とサンプルの各 well に Griess 試薬を 35μ L づつ加える。

6）　10 分間室温でインキュベーション。途中、泡をつぶす（注射用針にて）

7）　プレートミキサーにて攪拌し液を均一にする。

8）　550nm の波長で、各 well の吸光度を測定する。

9）　標準 Nitrite の吸光度より、検量線を作成し、それより各サンプルの Nitrite 含量を算出する。

3）判定方法

・異物刺激群（サルモネラ死菌体菌液作用群）の一酸化窒素量産生量（一酸化窒素は水溶液中で短命であるため実際は酸化物である亜硝酸塩濃度を測定している）から異物非刺激群の一酸化窒素産生量を差し引いて判定する。一酸化窒素の産生量が多ければ、異物に対して高く毒性を発揮していることから異物排除能が優れていると判定する。但し、一酸化窒素は体内に長時間残るとストレスの原因となるので in vitro で経時的に測定することが理想であり、攻撃試験等を実施して生産性と絡めて判断するのが好ましい。

4）参考文献等

澤則之ら：徳島県立畜産研究所研究報告書 4,47-50（2004）

NO 産生量測定法は徳島文理大学健康科学研究所で実施されている手法を参考。